

Proyecto: Caracterización bioquímica de plantas de sorgo asociadas a hongos micorrízicos sometidas a condiciones de estrés por carencia de agua.

Alumno: Elvis Alejandra Rivera Moreno

Carrera: Ing. Bioquímica

No. de control: 10270445

Asesor interno:

Dr. Víctor Manuel Ruíz Valdiviezo

Asesor externo:

Dra. Silvia Edith Valdés Rodríguez

Tuxtla Gutiérrez, Chiapas a 23 de Diciembre del 2014

ÍNDICE

JUSTIFICACION	3
OBJETIVOS	4
OBJETIVOS ESPECIFICOS	4
PROBLEMAS A RESOLVER.....	4
PROCEDIMIENTO Y DESCRIPCION DE ACTIVIDADES	5
Obtención del tejido a utilizar	5
Protocolo para detectar oxalato oxidasa en hojas de sorgo	6
Protocolo para determinar ABA en hojas de sorgo	7
RESULTADOS Y DISCUSION.....	98
CONCLUSIONES	2021
RECOMENDACIONES	2021
COMPETENCIAS DESARROLLADAS Y/O APLICADAS	2021
Bibliografía	21
ANEXOS	23
Ubicación del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional Unidad Irapuato, sobre la carretera Irapuato-León.....	23
Ubicación del Laboratorio 1 “Bioquímica y Biología Molecular de Proteínas” en el Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional. Unidad Irapuato.....	2425

JUSTIFICACION

Las hormonas controlan el desarrollo de plantas coordinando cambios en la expresión de numerosos genes en etapas cruciales del desarrollo en los diferentes tejidos de manera órgano específica (Gonzalez, 2011)

El Ácido Abscísico (ABA) y la oxalato oxidasa (OXO) son proteínas que se presentan como respuesta a diferentes tipos de estrés tal como el estrés ambiental, estrés fisiológico o estrés bioquímico.

Los periodos de sequía son una característica inevitable y recurrente de la agricultura mundial y, a pesar de la capacidad de las sociedades humanas para mejorar la predicción de su arribo y modificar su impacto, la sequía sigue siendo hasta ahora el factor más importante para la seguridad alimenticia de la población humana. En nuestro afán de hacer que la vida sea más práctica y pagar barato hemos llegado a un punto en el que estamos acabando con nuestro entorno, nuestro planeta.

El propósito de realizar estos estudios es para conocer el proteoma y su genoma de la planta cuando éstas están sometidas a estrés ambientales y con ello se puede inhibir la síntesis de proteínas que dañen a la producción o incitamos la biosíntesis de ellas con la intención de mejorar la calidad nutrimental de las plantas y obtener mejoras genéticas en las plantas y por ende mejorar la calidad de vida de la humanidad.

OBJETIVOS

Determinar los cambios en los niveles de ABA y de oxalato oxidasa en plantas de sorgo con y sin micorriza bajo condiciones de estrés por carencia de agua.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

Estandarizar las condiciones de las técnicas para identificar la presencia de oxalato oxidasa y ácido abscísico.

Evaluar la actividad de la enzima oxalato oxidasa y el ácido abscísico en hojas de cultivos de sorgo sometidos a estrés hídrico.

Conocer la actividad de oxalato oxidasa en plantas de sorgo sometidas a estrés por carencia de agua.

Determinar la influencia de la micorriza con respecto a la presencia de ácido abscísico en las hojas en condiciones de estrés hídrico.

PROBLEMAS A RESOLVER

Al someter a las plantas a condiciones de estrés éstas expresan cambios físicos y químicos por lo tanto se desea conocer la actividad que tienen las enzimas en las plantas además de la abundancia o inexistencia cuando se encuentra en estas condiciones ambientales.

PROCEDIMIENTO Y DESCRIPCION DE ACTIVIDADES

Obtención del tejido a utilizar

El material vegetal utilizado en el presente trabajo fue proporcionado por el Dr. Víctor Olalde Portugal del laboratorio de Bioquímica Ecológica del Cinvestav, Unidad Irapuato.

Se utilizaron plantas de sorgo (*Sorghum vulgare*) variedad BJ 83 Caloro crecidas bajo condiciones de invernadero, con un diseño experimental de bloques al azar con 4 tratamientos:

1. <i>Glomus clarum</i> con estrés
2. <i>Glomus clarum</i> sin estrés
3. Consorcio selva con estrés
4. Consorcio selva sin estrés

Tabla 1. Tratamientos de inoculación de plantas de sorgo.

El primer inoculo estuvo (Tratamiento 1 y 2) conformado únicamente por el hongo *Glomus clarum*.

Las plantas se inocularon con un consorcio de hongos micorrízicos (Tratamiento 3 y 4), el consorcio Selva, integrado por las siguientes especies: *Glomus constrictum*, *Glomus geosporum*, *Glomus fasciculatum*, *Glomus tortuosum* y *Acaulospora scrobiculata*.

La germinación de las semillas se llevó a cabo en macetas de 3.5 litros que contenían una mezcla de limo/arena en relación 1:2, colocando 4 semillas por maceta. Las macetas se colocaron en bloques completamente al azar con 10 repeticiones cada uno. A los 15 días de germinación se realizó un raleo dejando una planta por maceta tratando de que la planta seleccionada fuera la más sana y de tamaño uniforme (Padró, 2014).

Todas las plantas se regaron a saturación total (150 ml de agua/día). El estrés hídrico se inició 56 días después de la siembra y se aplicó el estrés hídrico por siete días en modo gradual siguiendo el siguiente esquema:

Día	ml de agua por maceta	Capacidad de campo (%)
1	100	66.6
2	80	53.3
3	60	40.0
4	40	26.6
5	20	13.3
6	0	0
7	Fin de estrés hídrico	

Tabla 2. Tomado de (Padró, 2014)

Posteriormente se recolectaron las plantas (63 días después de la siembra). Primeramente se enjuagaron las raíces para eliminar los residuos de tierra y después se separaron en hojas, tallo y raíz para finalmente conservarlas a -70 °C para su próximo análisis (Padró, 2014).

Protocolo para detectar oxalato oxidasa en hojas de sorgo

Se realizó una curva estándar de albúmina sérica bovina para determinar la cantidad de proteína incógnita como se indica en la tabla 1. Se determinó en la curva estándar que las absorbancias adecuadas deben estar entre 0.3 y 0.4 ya que los valores se encuentran en este rango (Thermo scientific, 2014).

Para detectar oxalato oxidasa solo se trabajó con el tratamiento con micorriza con estrés.

Se pesó 1 gramo de hoja de sorgo y se homogenizó con nitrógeno líquido una vez obtenido un fino polvo se suspendió en 1.5 ml de agua, se agitó por 30 minutos en frío y se centrifugó en la microcentrífuga 'ependorf 5424' a 12500 rpm durante 30 minutos en frío, se recuperó el sobrenadante y se cuantificó el contenido de proteína por el método de Bradford, posterior a la cuantificación se precipitó la proteína a un 75% de saturación con sulfato de amonio agregándolo lentamente hasta disolverlo por completo, se agito en frío por 10 minutos y se centrifugó a 14000 rpm por 10 minutos, se descartó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 100 µl de H₂O y se cuantifico nuevamente con el método de Bradford y el resto de la muestra se dializó en una cámara MICRODYALISIS SYSTEM BRL. Después de dializar se centrifugo por 1 minuto a 12000 rpm, se rescató el sobrenadante y se cuantifico el contenido de proteína con el método de Bradford (ver tabla 2.). Posteriormente, las 3 muestras (extracto crudo (E.C.), extracto precipitado (E.P.) y extracto dializado (E.D.)) fueron inyectadas en geles al 12% de poliacrilamida estos tenían 10 pozos para agregar las muestras (E.C., E.P. y E.D.) las cuales pasaron por dos procesos; la precipitación para concentrar la proteína y diálisis que es para descartar la sales que se le agregaron a la

muestra y que ésta en un principio contenía. Depositando 1:1 v/v (muestra: buffer de carga) y se corrieron los geles a 20 mA la zona concentradora durante 20 minutos y a 30 mA la región separadora determinando un tiempo de corrida de 2:30 minutos. Los geles se depositaron en un recipiente que contenía una solución desarrolladora (ácido succínico 40 mM a pH 3.8, etanol al 60%, ácido oxálico 2Mm, peroxidasa de rábano 5U/ml y 4-cloro-1-naphtol 50mg/100ml) se dejó reposar hasta poder observar las bandas en los geles (Dumas, 1993).



Figura 1. Ejecución de experimento para detectar oxalato oxidasa a través de SDS-PAGE (Moreno, 2014).

Protocolo para determinar ABA en hojas de sorgo.

Se pesaron 0.4 g de hojas de sorgo las cuales fueron molidas con nitrógeno líquido hasta obtener un fino polvo para posteriormente adicionarle 2 ml de solución de extracción que contenía 80% de metanol y 1% de ácido acético; la extracción se realizó durante 24 horas a 4°C. A las 24 horas de extracción se procedió a centrifugar por 10 minutos a 3000 rpm, se separó el sobrenadante y se concentró durante 1 hora y 30 minutos en la centrifuga 'vacufuge plus' a 30°C al vacío. Al tener la muestra concentrada se resuspendió en 1 ml de metanol al 10% y 0.2 M de ácido acético (solución de resuspensión). Se filtró la muestra en una membrana hidrofóbica HVHP con una apertura de poro de 0.45 µm, posteriormente se hacía pasar la muestra a través de una columna Sep-pack c-18 de Sigma-Aldrich, con capacidad de volumen de 2 ml, la columna previamente se debe lavar con 10 ml de agua, activar con 10 ml de metanol grado HPLC y equilibrar con 10 ml de solución de resuspensión, después de pasar la muestra en la columna esta se lavó con 10 ml de solución de resuspensión para retirar contaminantes de la columna y se recuperaron fracciones de 1 ml esto para tomar lecturas con un espectrofotómetro DU-50 BECKMAN a 270nm y determinar que la columna esté funcionando correctamente, consecutivamente se hizo pasar una solución de elución 5 ml y también se recuperaron fracciones de 1 ml para tomar lecturas; las eluciones con las lecturas más altas fueron concentradas durante 1

hora y 40 minutos, teniendo las muestras concentradas cada una se resuspendió en 50 μ l de metanol grado HPLC al 10% para ser analizadas en HPLC con el método de gradiente de elución.

Tiempo (Minutos)	Gradiente (Porcentaje)
0	50%
10	70%

Tabla 3. Programa de flujo en HPLC.

Para la determinación por HPLC se utilizó una columna zorbax C-18 que tiene un tamaño de partícula de 80 Å y con dimensiones de 4.6 mm de diámetro a 250 mm de largo y una fase móvil de metanol, ácido acético y agua (60%,1%,40% v/v/v) (Zahradnicková, 1991, Dobrev & Kamínek, 2002 y Alves & Setter, 2014).

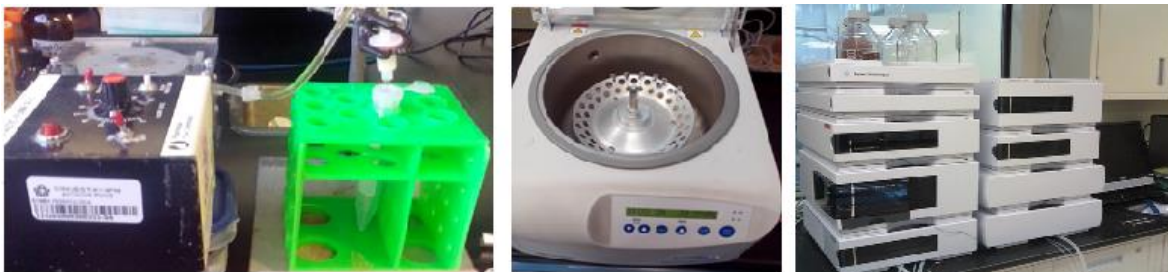


Figura 2. Procesos de experimentación para detectar ABA (Moreno, 2014)

RESULTADOS Y DISCUSION

Se realizaron los análisis con hojas de plantas de sorgo sometidas a estrés hídrico con micorriza.

	Proteína (µl)	H ₂ O (µl)	Reactivo Bradford (µl)
Extracto acuoso	1	399	100
	5	395	100
	10	390	100
Blanco	-	400	100

Tabla 4. Curva estándar por el micrométodo de Bradford de albumina sérica bovina.

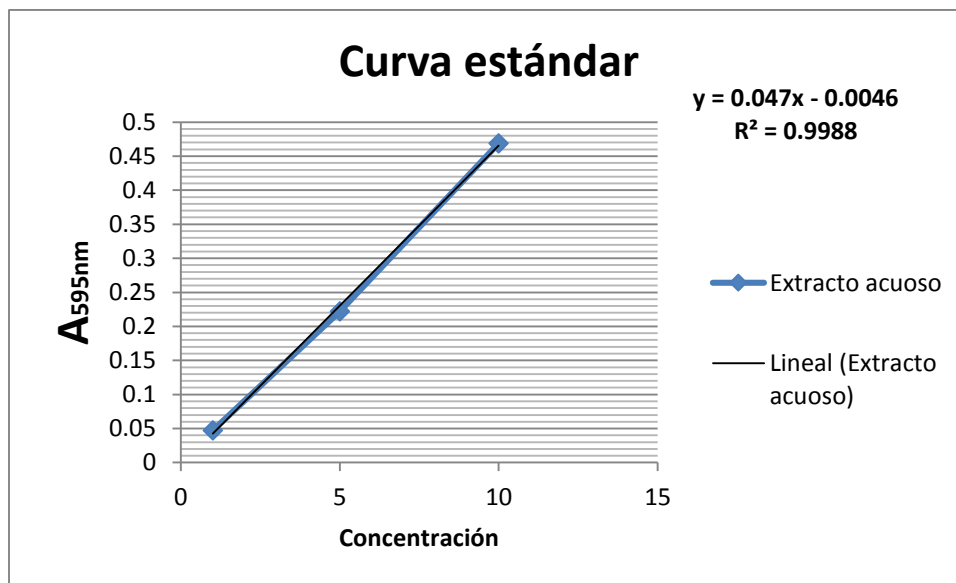


Figura 3. Curva estándar de albumina sérica bovina para la posterior cuantificación de proteína total.

Tabla 5. Absorbancias y concentraciones de los extractos experimentados. Para la cuantificación se consideraron las absorbancias más altas o las que se encontraran entre 0.3 y 0.4 considerando la curva estándar.

Muestra	Experimento 1			Experimento 2			Experimento 3			Experimento 4			Experimento 5		
	EC	EP	ED	EC	EP	ED	EC	EP	ED	EC	EP	ED	EC	EP	ED
1 µl		0.257			0.192			-			0.035				0.027
2 µl	0.191	0.34	0.274	0.131	0.291	0.142	0.159	-	0.127	0.315	0.016	0.002	0.163	0.026	0.028
4 µl	0.299		0.326	0.235		0.157	0.33		0.168	0.485		0.034	0.299	0.047	
Concentración de proteína total de la muestra (µg)	652.2	503.9	571.7	613.2	421.3	284	384.9		1.07	392.5	0	0	184.8	0	0

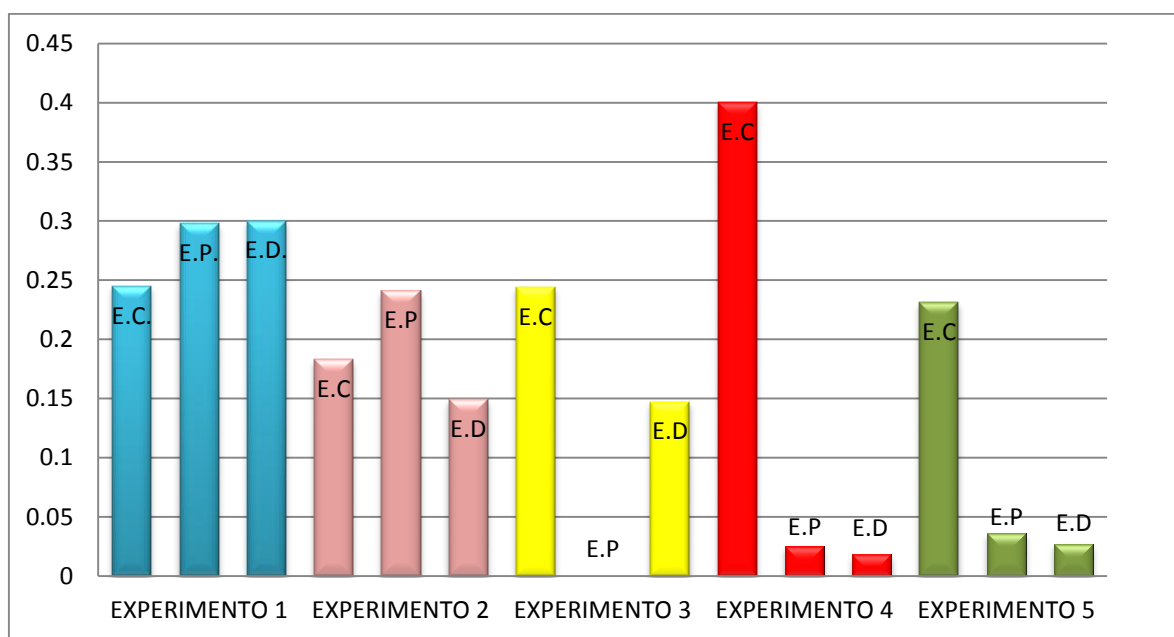


Figura 4. Contenido de proteínas totales de tres diferentes extractos.

$$\frac{\text{concentración } (\mu\text{g})}{\text{alícuota } (\mu\text{l})} = \text{concentración } \frac{\mu\text{g}}{\mu\text{l}}$$

$$\text{concentración} \frac{\mu\text{g}}{\mu\text{l}} * \text{volumen total de muestra} (\mu\text{l}) = \mu\text{g totales de la muestra}$$

Fórmulas. Ecuaciones utilizadas para cuantificar la cantidad de proteína en las muestras.

Éste experimento se realizó 5 veces de los cuales dos de ellos se pudo observar un ligero bandeo después de 26 días y el otro se observó a los 41 días, dado que el periodo de detección de resultado fue largo y las bandas estuvieron en un peso bajo, respecto a 100kDa que indica Dumas et al, 1993; entonces no hay detección de oxalato oxidasa en geles al 12% Ver contenido de los geles en la tabla 3.

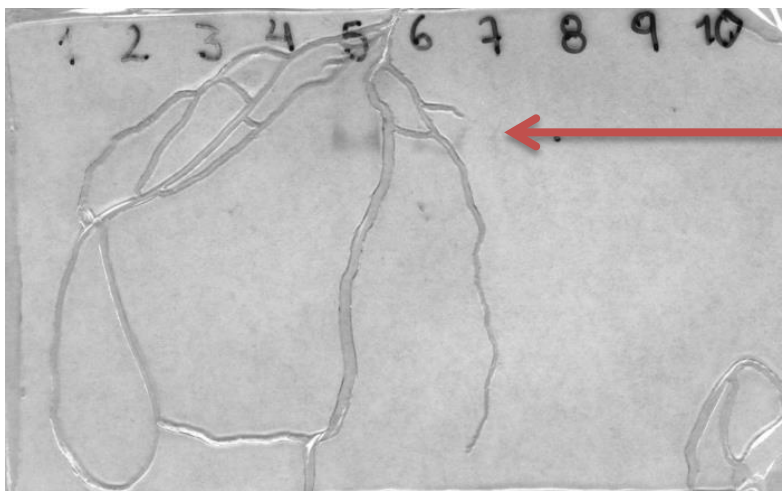


Figura 5. Gel 12%. Hoja de sorgo: M1SE-HR4. Hoja sin micorriza con estrés.

50 kDa. Precipitado a un 75% y dializado. 41 días de incubación a temperatura ambiente. Experimento 1 (Moreno, 2014).

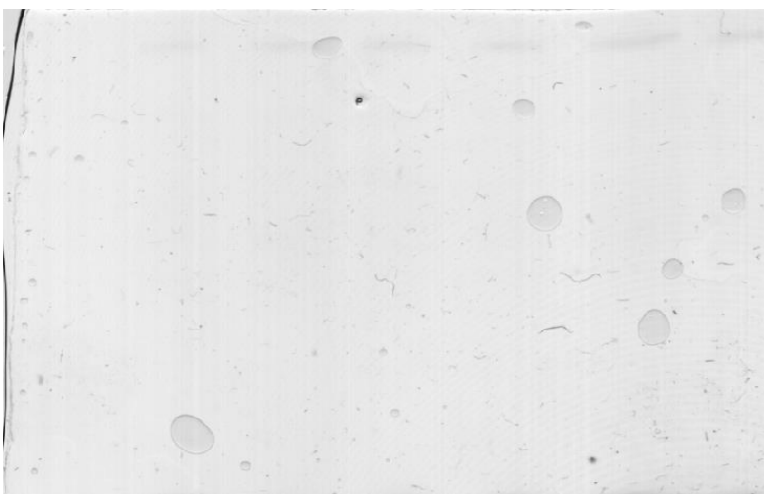


Figura 6. Gel 12%. Hoja de sorgo: M1SE-HR4. Hoja sin micorriza con estrés.

80 kDa. Precipitado a un 75% y dializado. 26 días de incubación a temperatura ambiente. experimento2 (Moreno, 2014).

Pozo	Contenido	Muestra (μl)	Proteína (μg)	Total (μl)
1	E.C.	15	14.6	30
2	E.C.	7.5	7.1	15
3	E.C.	2.5	2.4	5
4	E.D.	15	14.6	30
5	E.D.	7.5	7.1	15
6	E.D.	5	4.8	10
7	E.D.	2.5	2.4	5
8	Sin Muestra	-	-	-
9	Sin Muestra	-	-	-
10	Sin Muestra	-	-	-

Tabla 6. Contenido de los pozos de los geles al 12%.

En los experimentos 3, 4 y 5 no se observó actividad de oxalato oxidasa considerando que la cantidad de proteína es mucho menor en comparación con los experimentos 1 y 2 de los cuales se obtuvieron geles con bandas poco marcadas, notando así que aun cuando la cantidad de proteína es mayor no era suficiente para observar su actividad, se sabe que cuando la proteína se calienta esta desnaturaliza en los experimentos 4 y 5 se calentó la muestra antes de precipitarla a 80°C por 3 minutos, se entiende que se perdió proteína. Comparando que las bandas obtenidas son de muestras dializadas en los experimentos 4 y 5 no se obtuvo resultado ya que la proteína fue descartada al ser calentada la muestra.

Singh & Pundir (2006) reportan que se ha detectado oxalato oxidasa en raíces de las plantas que cuando las plántulas de sorgo se encuentra bajo estrés por cloruro de sodio (NaCl) oxalato oxidasa aumenta en las hojas, ellos detectan a la enzima con un peso molecular de 117 kDa. Regularmente las proteínas no siempre se encuentran en el mismo sitio del gel que en otros, puesto que la polimerización del gel puede permitir el paso de las proteínas con mayor facilidad o puede retenerlas dependiendo de su pH o preparación del gel.

Ziguo-Zan et al. (1996) no detecto oxalato oxidasa hasta que le adiciono etanol para difundir la reacción ya que provoca la sensibilidad de la proteína hasta 40 veces más haciéndola más estable y más activa.

Por otra parte ABA fue analizado por la técnica HPLC. El tiempo de retención estándar es de 5.238 min (Figura 3).

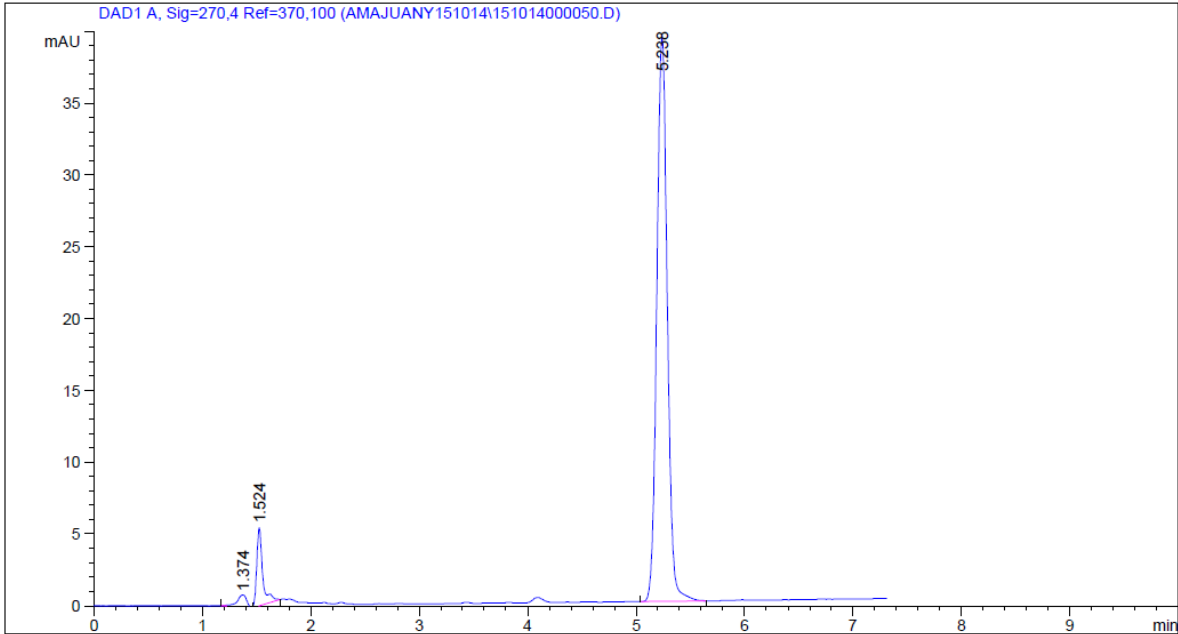


Figura 7. Perfil de elución 1. Curva estándar de ABA fué proporcionada en el laboratorio de cromatografía de CINVESTAV unidad Irapuato. El método utilizado fue gradiente de elución y está conformado por alcohol y ácido acético adicionando 50% al tiempo 0 y 70% al tiempo 10 en HPLC.

La elución 1 tiene picos gruesos y/o juntos pero no se detectaba ABA determinando que en esta elución se concentraban otros compuestos; posibles contaminantes.

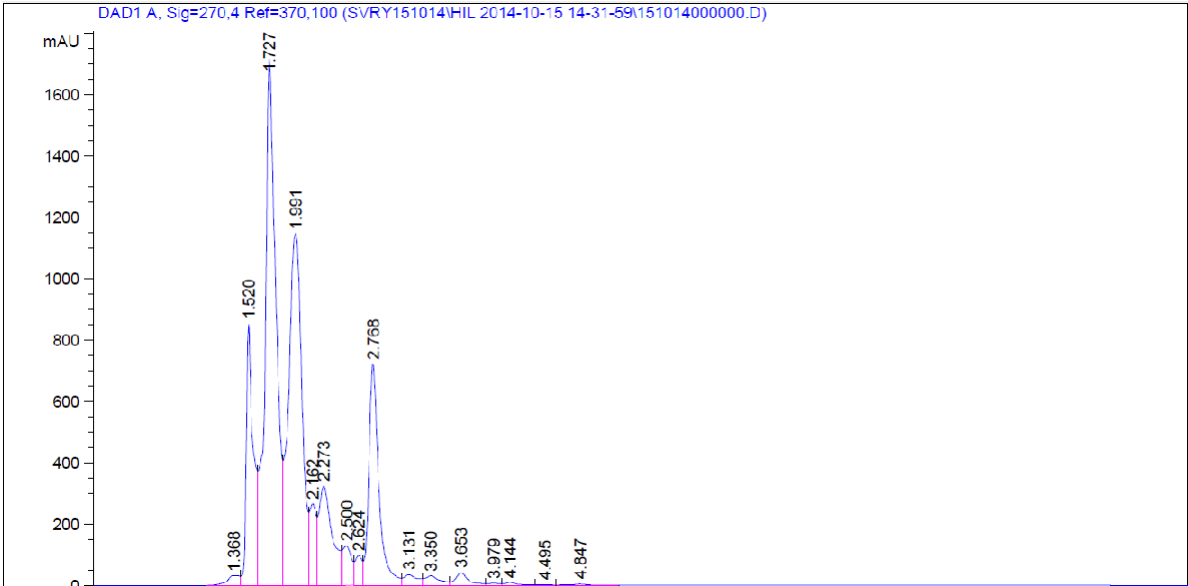


Figura 8. Perfil de elución 2. E1 muestra con micorriza con estrés. Sin detección de ABA.

Así mismo, en las eluciones 3, 4 y 5 no existía presencia alguna de ABA y presentaban algunos picos.

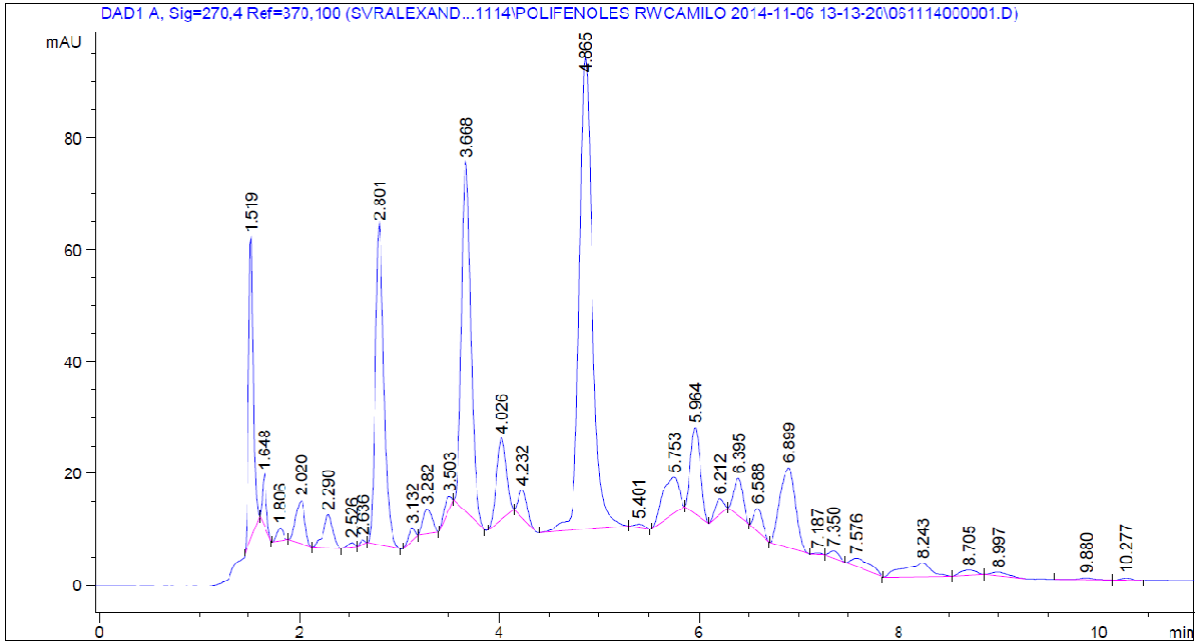


Figura 9. Perfil de elución 3. E3. Tratamiento *Glomus clarum* con estrés. Sin detección de ABA.

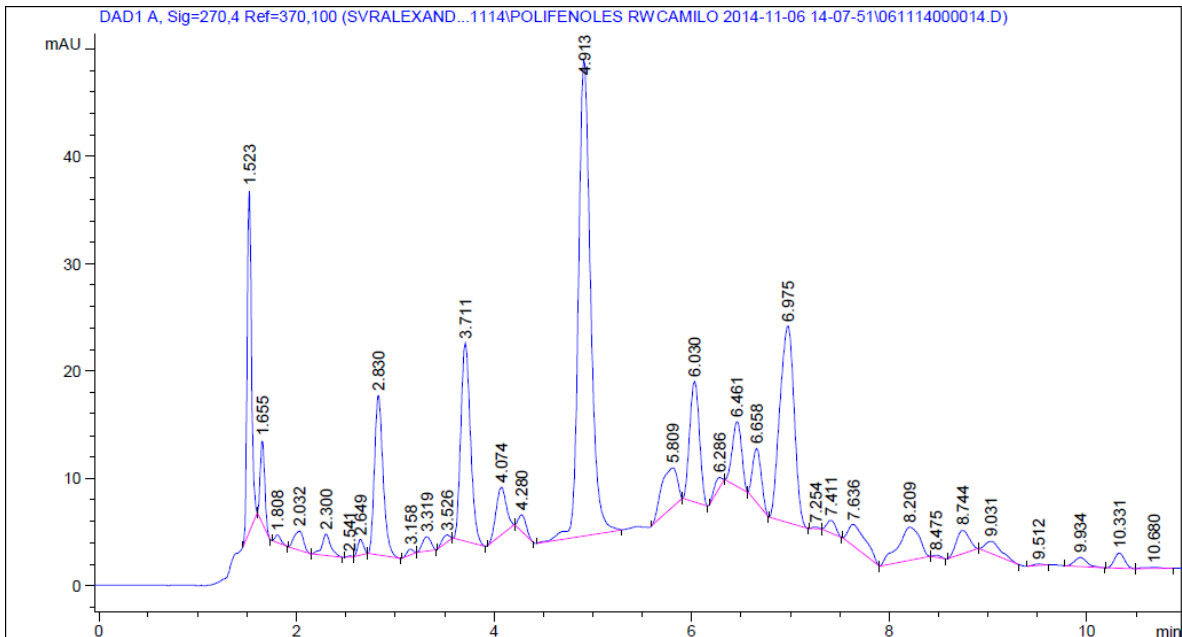


Figura 10. Perfil de elución 4. E4. Hojas de plantas de sorgo. Tratamiento *Glomus clarum* con estrés. Sin detección de ABA.

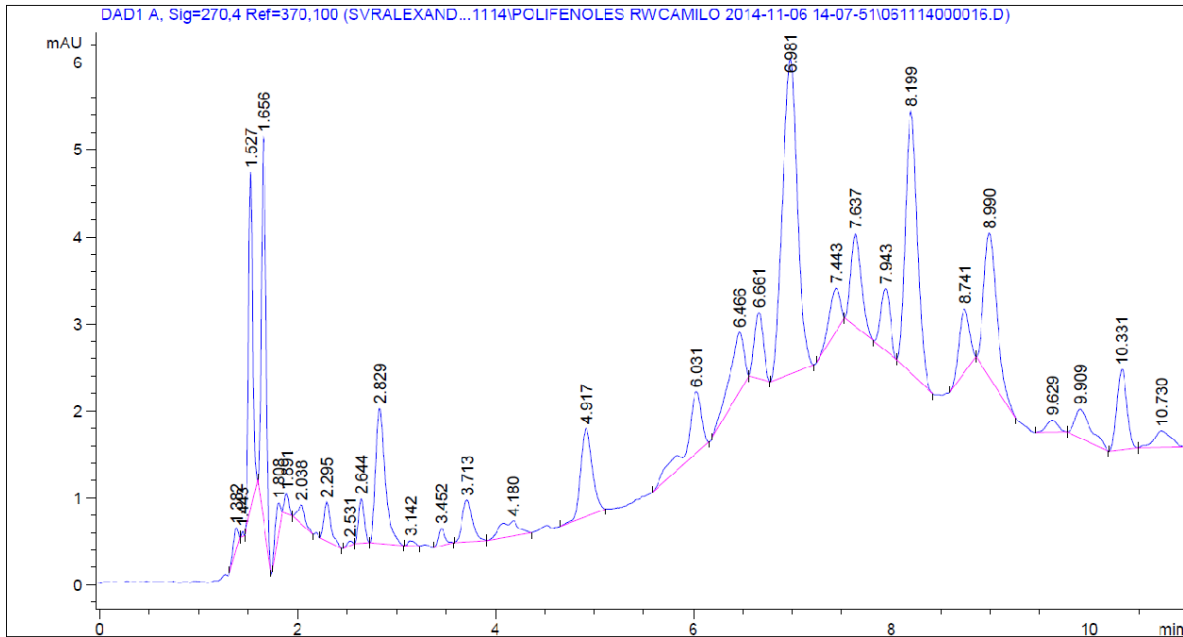


Figura 11. Perfil de elución 5. E5. Tratamiento *Glomus clarum* con estrés. Sin detección de ABA.

Dilucidando que las eluciones 2 es donde la muestra contenía ABA. A continuación se presentan cromatogramas con seis diferentes tratamientos.

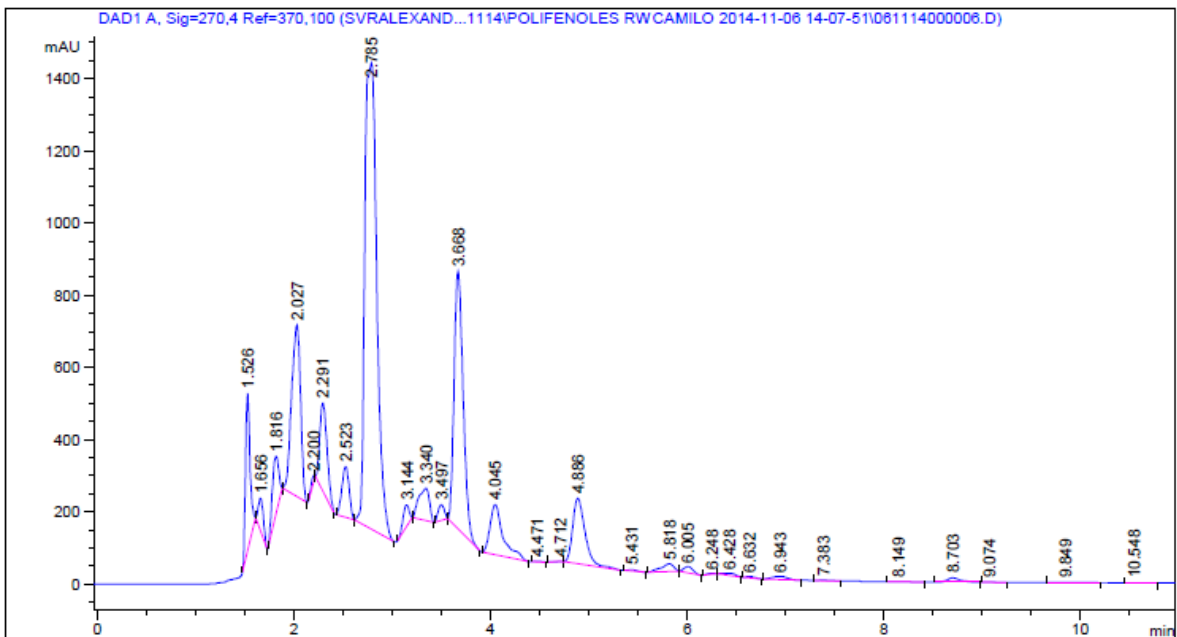


Figura 12. Perfil de elución 6. Tratamiento control sin inoculo con estrés. De acuerdo con el estándar que se tiene no hay detección de ABA.

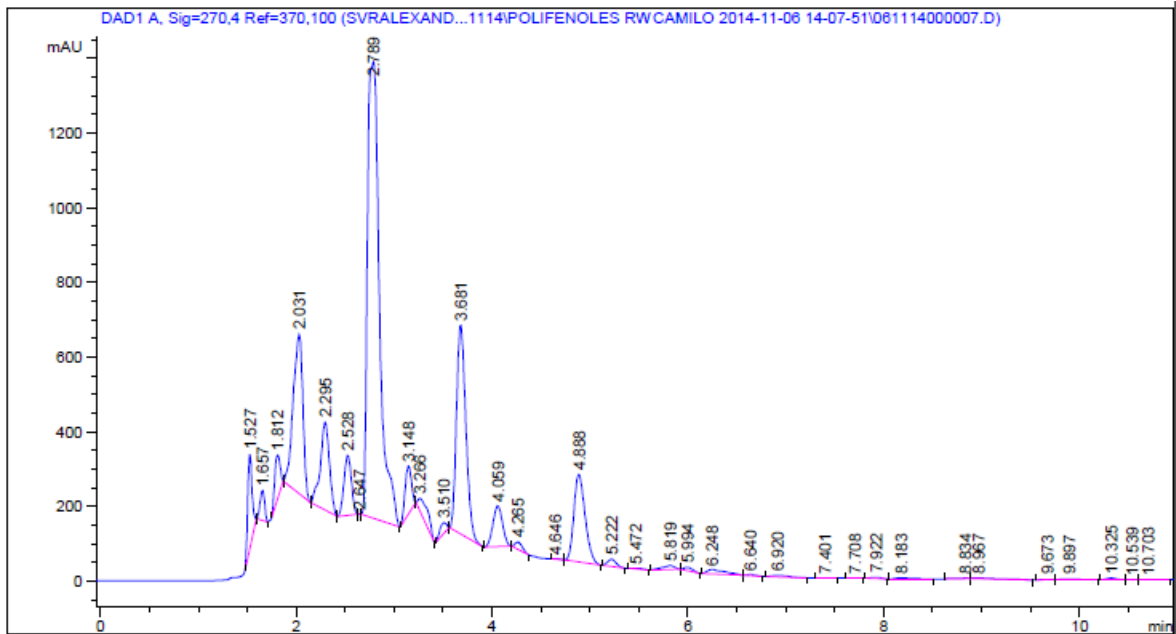


Figura 13. Perfil de elución 7. Tratamiento control sin inoculo sin estrés. Hay ABA el pico con el tiempo de retención 5.222 lo representa.

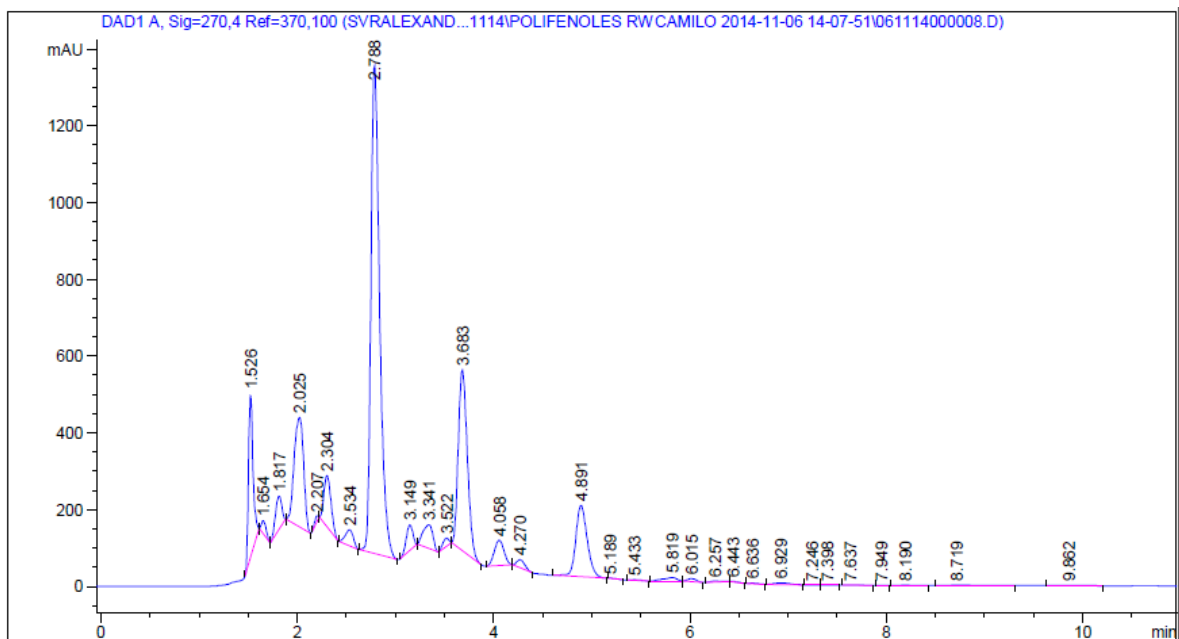


Figura 14. Perfil de elucion 8. Tratamiento: *Glomus clarum* con estrés. Hay un tiempo de retencion de 5.18 que podria ser ABA pero esta junto a otro pico lo cual descarta la posibilidad de que sea;por lo tanto puede ser un compuesto parecido a ABA.

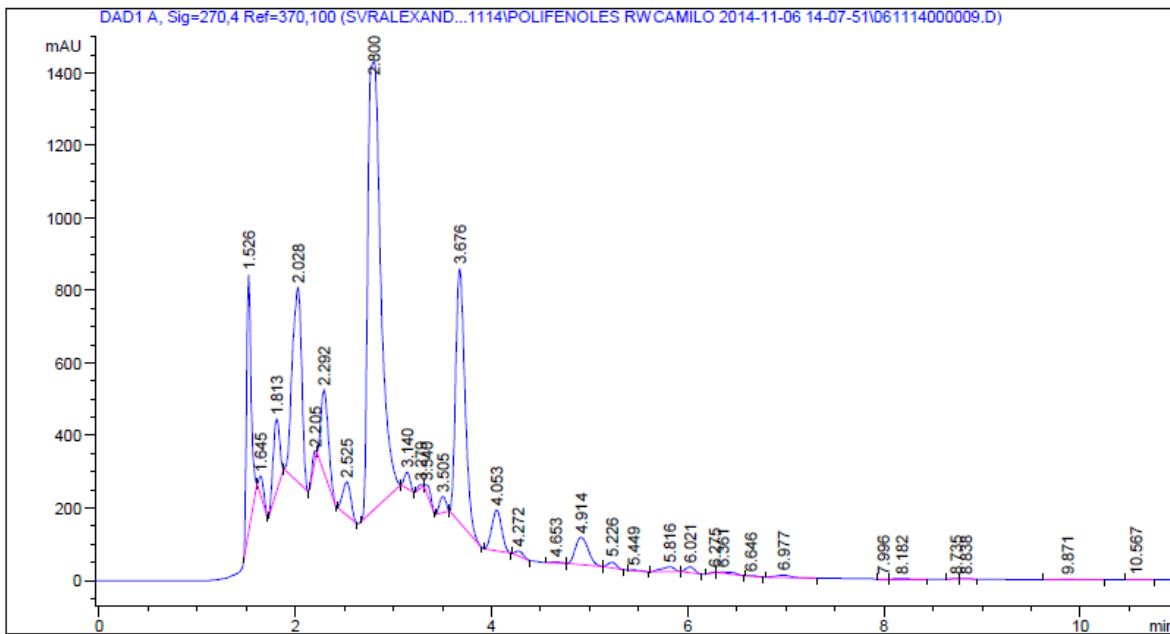


Figura 15. Perfil de elucion 9. Tratamiento *Glomus clarum* sin estrés. Hay ABA y se representa con el pico que tiene un tiempo de retencion de 5.226.

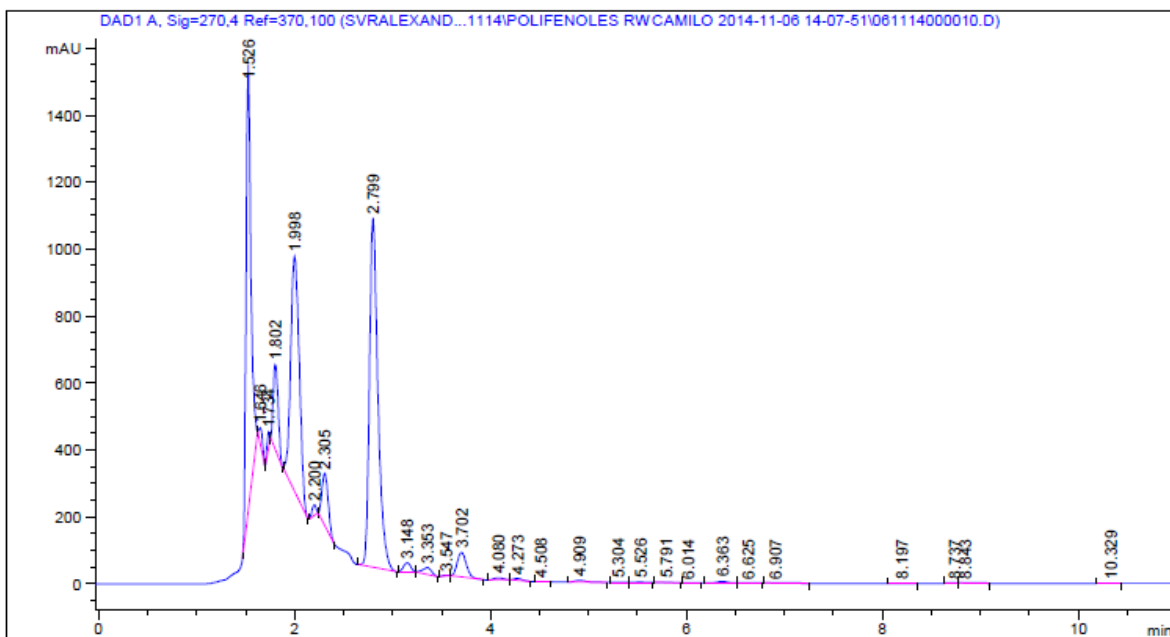


Figura 16. Perfil de elución 10. Tratamiento: Consorcio selva con estrés. No hay ABA .

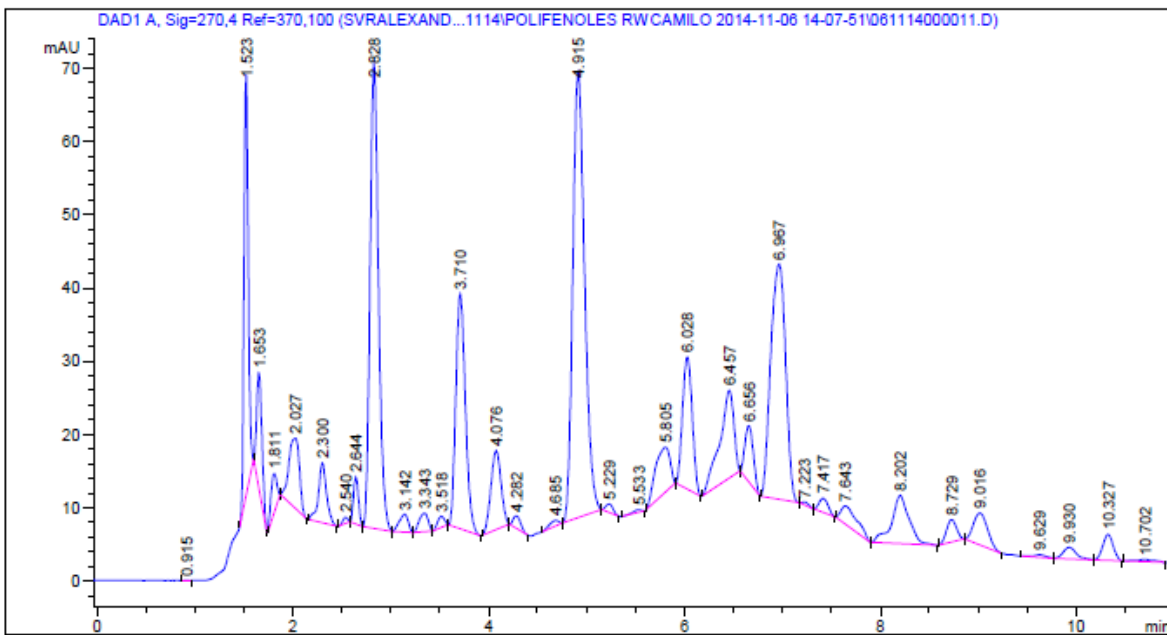


Figura 17. Perfil de elución 11. Tratamiento Consorcio selva sin estrés. Hay ABA con un tiempo de retención de 5.229.

En este perfil de elución se muestra una replica 2 del tratamiento *Glomus clarum* sin estrés (Solo en este se muestra la segunda replica puesto que fue el pico mas pronunciado que se obtuvo de las replicas).

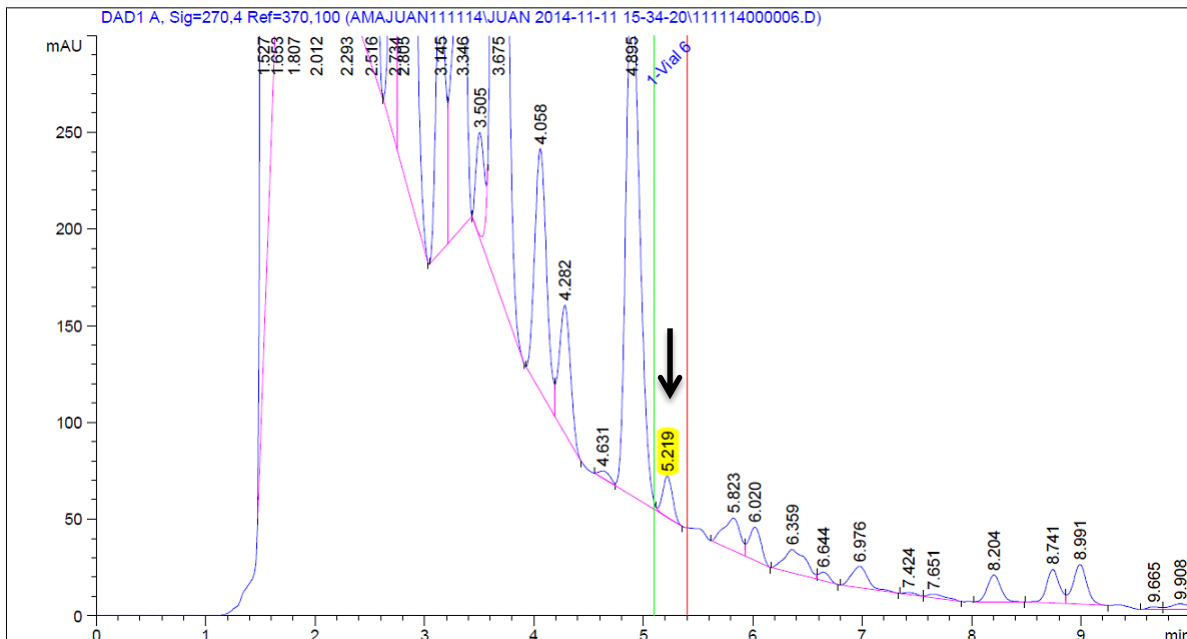


Figura 13. Perfil de elución 12. Muestra *Glomus clarum* sin estrés.

Para confirmar que los resultados obtenidos eran certeros se adicionó un estandar interno (ABA comercial) y la molecula detectada por HPLC no es ABA ya que el pico obtenido debia alargarse y eso no ocurrió. Ver perfil de elución 13.

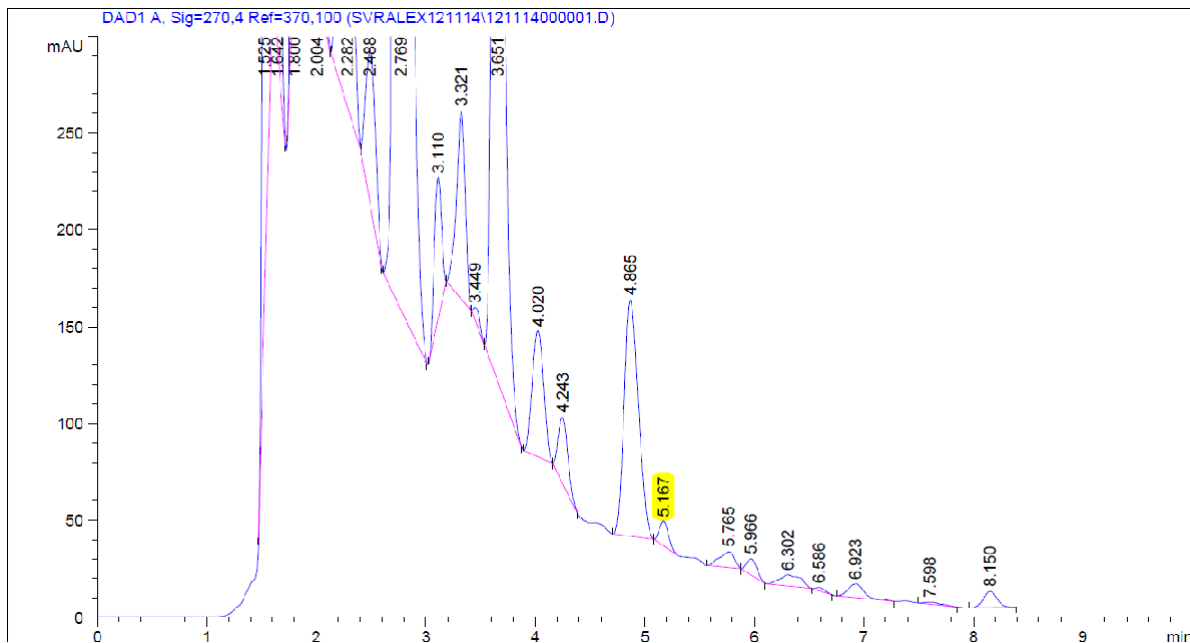


Figura 18. Perfil de elución 13. Tratamiento *Glomus clarum* sin estrés + ABA comercial.

Con estos estudios se entiende que las plantas aún bajo condiciones de estrés no presenta concentración de ABA, esto puede deberse en gran medida a la interacción con los hongos micorrízicos con la que se encontraba, las cuales ayudan a que la planta no sufra tanto cuando está sometida a estrés de cualquier género. Asemajándose así a los estudios reportados por Zhilei-Liu et al 2014 en donde plantas de soya no micorrizadas existe una mayor cantidad de muertes en comparación a las que presentan esta asociación. Lim et al 2014 reportaron que el cierre de los estomas favorece a las plantas reservando agua, impidiendo el exceso de sales siendo que regula la tolerancia del estrés abiótico y las señalizaciones de ABA, se superponen como respuesta de defensa a estreses abióticos. Además, Lim et al. 2014 mencionan que ABA también puede provocar que las raíces de las plantas no tengan la suficiente elongación según experimentos realizados en Arabidopsis.

CONCLUSIONES

La actividad de oxalato oxidasa requiere de un largo periodo para ser detectada es necesario considerar la concentración de la proteína en la muestra, la cantidad de sales que posee y la cantidad de enzima que se adiciona en la solución desarrolladora y así lograr detectar la actividad de la enzima en geles al 12%.

Para lograr que ABA se manifieste es necesario tener cuidado con el proceso de extracción ya que las fitohormonas se encuentran en bajas cantidades en las plantas además de que ésta es fotosensible, se requiere de mejorar la técnica u ocupar técnicas más sensibles para evitar errores en los análisis.

RECOMENDACIONES

Es necesario ser precavido en el proceso de estudio ya que las proteínas son sensibles a cualquier cambio. La electroforesis se debe realizar en frío para evitar la desnaturalización de proteínas por calor y la separación y purificación por Cromatografía debe hacerse cuidadosamente para no perderla en el proceso.

COMPETENCIAS DESARROLLADAS Y/O APLICADAS

Realizar investigación científica y tecnológica en el campo de la ingeniería bioquímica y difundir sus resultados.

Trabajar en equipos multidisciplinarios y multiculturales con liderazgo, sentido crítico y comprometido con la calidad.

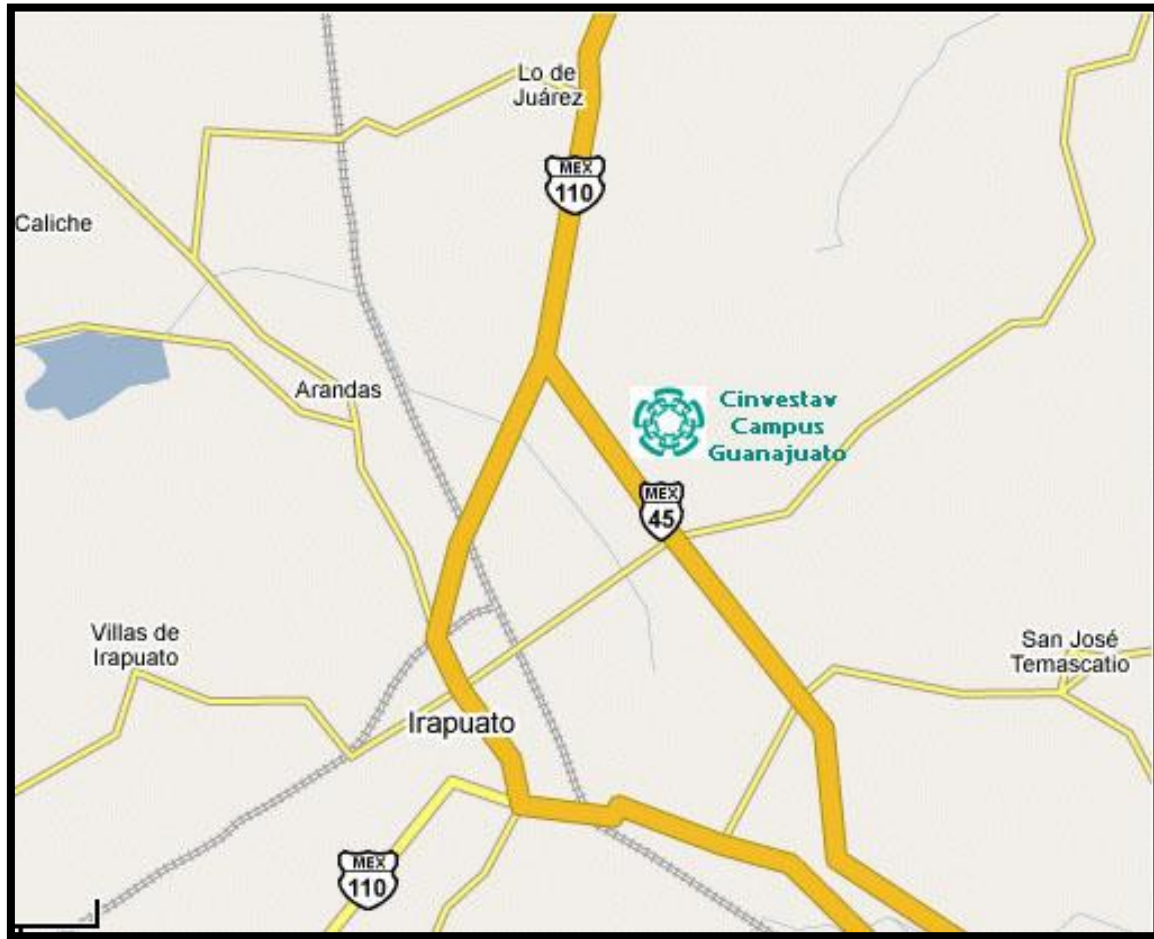
Bibliografía

- Alves, A., & Setter, T. (2014). Response of Cassava to water deficit: Leaf area growth and abscisic acid. *Crop Science*.
- Castro et al. (2011). Nitrate regulates floral induction in Arabidopsis, acting independently of light, gibberellin and autonomous pathways. *Planta*, 539-552.
- Castro, X. (2013). "Análisis proteómica de la respuesta de las hojas de plantas de sorgo a la irrigación, después de haber sido sometidas a tratamientos de estrés hídrico". Culiacan, Sinaloa: Instituto Tecnológico de Culiacán.
- Dobrev, P. I., & Kamínek, M. (2002). Fast and efficient separation of cytokinins from auxin and abscisic acid and their purification using mixed-mode solid-phase extraction. *ELSEVIER*, 21-29.
- Dumas et al. (1993). Characterization of oxalate oxidase: a plant enzyme capable of degrading the major phytotoxin produced by *Sclerotinia sclerotiorum*. In J. C. B. Dumas, *Mechanisms of plant defense responses*. (p. 451). Netherlands: European foundation for plant pathology.
- Dumas, J. C. (1993). Characterization of oxalate oxidase: a plant enzyme capable of degrading the major phytotoxin produced by *Sclerotinia sclerotiorum*. In J. C. B. Dumas, *Mechanisms of plant defense responses*. (p. 451). Netherlands: European foundation for plant pathology.
- González, G. (2010). *Plantas tóxicas de importancia en salud y producción animal en Colombia*. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia.
- Gonzalez, L. (2011). *Ácido Abscísico: Importante modulador de la Ruta Fenilpropanoide en bayas de vid cv. Carménère*. FACULTAD DE CIENCIAS INSTITUTO DE QUÍMICA SECCIÓN BIOQUÍMICA.
- Lane et al. (1993). Germin, a protein marker of early plant development, is an oxalate oxidase. *J Biol Chem*, 12239-12242.
- Lim et al. (2014). The pepper late embryogenesis abundant protein CaLEA1 acts in regulating abscisic acid signaling, drought and salt stress response. *Physiologia Plantarum*, 156-756.
- Moomaw et al. (2014). Membrane inlet mass spectrometry reveals that *Ceriporiopsis subvermispora* bicupin oxalate oxidase is inhibited by nitric oxide. *ELSIER*, 750-754.
- Moreno, A. (2014). *CINVESTAV*. México: CINVESTAV.
- Nadeem et al. (2014). The role of mycorrhizae and plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) in improving crop productivity under stressful environments. *Biotechnology Advances*, 429-448.

- Padró, M. (2014). *Análisis proteómico de la respuesta al estrés hídrico en raíces de plantas de sorgo asociadas a hongos micorrízicos*. Irapuato: CINVESTAV.
- Singh et al. (2006). Purification and properties of oxalate oxidase from NaCl Stressed grain sorghum seedlings. *Springer*, 55-57.
- Thermo scientific. (2014). Overview of Protein Assays Methods. Meridian Rd.
- Tsavkelova et al. (2007). Bacteria associated with orchid roots and microbial production of auxin. *Microbiol*, 69-76.
- Woo et al. (2000). Germin is a manganese containing homohexamer with oxalate oxidase and superoxide dismutase activities. *Nat Struct Biol* 7, 1036-1040.
- Yen et al. (2007). CHARACTERIZATION OF WHEAT GERMIN (OXALATE OXIDASE) EXPRESSED BY *Pichia pastoris*. *ELSEVIER*, 925-929.
- Zahradnicková, H. (1991). High-performance thin- layer chromatographic and high- performance liquid chromatographic determination of abscisic acid produced by cyanobacteria. *ELSEVIERScience Publisher*, 239-245.
- Zhilei Liu et al. (2014). Coordinated regulation of arbuscular mycorrhizal fungi and soybean MAPK pathway genes improved mycorrhizal soybean drought tolerance. *American Physical Society*.
- Ziguo Zan et al. (1996). ethanol increases sensitivity of oxalate oxidase assays and facilitates direct activity staining in SDS gels. *Plant Molecular Biology* , 266-272.

ANEXOS

Ubicación del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional Unidad Irapuato, sobre la carretera Irapuato-León



Ubicación del **Laboratorio 1 “Bioquímica y Biología Molecular de Proteínas”** en el Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional. Unidad Irapuato.

